

**STABILIZATION OF ATPASE**

Publication number: JP10191972

Publication date: 1998-07-28

Inventor: HIGO YUKIKO; UCHIDA HIROMI

Applicant: TOYO INK MFG CO

Classification:

- international: C12N9/96; C12Q1/34; C12N9/96; C12Q1/34; (IPC1-7):  
C12N9/96; C12Q1/34

- European:

Application number: JP19970003453 19970113

Priority number(s): JP19970003453 19970113

[Report a data error here](#)

**Abstract of JP10191972**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for keeping ATPases, such as apirase, in a stable state for a long period without inactivating even after their freezing or lyophilization, not using any immobilization, by making albumin and an antiseptic coexist with an ATPase in a buffer at a specific pH. **SOLUTION:** This method includes coexistence of albumin (preferably, bovine serum albumin) and an aseptic (preferably, sodium azide) with an ATPase (in some cases, further coexistence of a chelator and an agent for protection of protein SH groups) in a buffer with pH 6.0-8.0. This method can stabilize ATPases essential for ATP assay, production of platelet agglutination inhibitors and biocompatible anti-thrombus materials and platelet washing, etc.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-191972

(43)公開日 平成10年(1998) 7月28日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 9/96

C 1 2 N 9/96

C 1 2 Q 1/34

C 1 2 Q 1/34

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平9-3453

(22)出願日 平成9年(1997) 1月13日

(71)出願人 000222118

東洋インキ製造株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番13号

(72)発明者 肥後 幸呼

東京都中央区京橋二丁目3番13号 東洋インキ製造株式会社内

(72)発明者 内田 弘美

東京都中央区京橋二丁目3番13号 東洋インキ製造株式会社内

(54)【発明の名称】 A T P加水分解酵素の安定化方法

(57)【要約】

【課題】 A T Pの測定、血小板凝集抑制剤、生体適合性の抗血栓材料の製造、血小板の洗浄等に不可欠なA T P加水分解酵素を安定化させる方法を提供する。

【解決手段】 A T P加水分解酵素をp H 6. 0～8. 0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤、更にキレート剤、タンパク質S H基保護剤等を共存させることを特徴とするA T P加水分解酵素の安定化方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ATP加水分解酵素をpH6.0～8.0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤を共存させることを特徴とするATP加水分解酵素の安定化方法。

【請求項2】 ATP加水分解酵素をpH6.0～8.0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤を共存させ、更にキレート剤を共存させることを特徴とする請求項1記載のATP加水分解酵素の安定化方法。

【請求項3】 ATP加水分解酵素をpH6.0～8.0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤を共存させ、更にタンパク質SH基保護剤を共存させることを特徴とする請求項1記載のATP加水分解酵素の安定化方法。

【請求項4】 ATP加水分解酵素がアピラーゼである請求項1、請求項2または請求項3記載のATP加水分解酵素の安定化方法。

【請求項5】 pH6.0～8.0の緩衝液がグッドの緩衝液で総括される緩衝液のうちの1つである請求項1、請求項2または請求項3記載のATP加水分解酵素の安定化方法。

【請求項6】 アルブミンがウシ血清アルブミンである請求項1、請求項2または請求項3記載のATP加水分解酵素の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ATP加水分解酵素の安定化方法に関する。更に詳しくは、ATPの測定、血小板凝集抑制剤、生体適合性の抗血栓材料の製造、更には血小板の洗浄等に不可欠なATP加水分解酵素の安定化方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ATP（アデノシン-5'-三リン酸）は、アデニン、D-リボース及び3個のリン酸基からなるヌクレオチドであり、呼吸、発酵及び光合成におけるリン酸化反応によって生成される。全ての細胞はATPを含み、ATPは生体反応、特にエネルギー代謝には不可欠である。従って、細胞あるいは生体組織におけるATPの測定は、細胞あるいは生体組織のエネルギー代謝活性を知る上で重要な指標となる。また、有用物質生産のバイオリアクターに、ATPは必須である。ATPの測定法には、イオン交換カラムでATPを分離し、核酸に由来する250～260nmの紫外線吸収量を測定することにより定量する方法、ATPがルシフェリンとホタルルシフェラーゼによって反応を起こし560～580nmの光を発する生物発光法を用いて定量する方法（M. A. DeLuca, *Advances in Enzymology*, 44, 37 (1976)）があるが、ATPをATP加水分解酵素で加水分解し、生じた無機リン酸を比色定量（C. H. Fiske and Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925)）してATP量を定量する方法、あるいは生じた水素イオンの量を測定してATPを定量する方法（特開昭61-12

2560）も知られている。

【0003】また、ATP加水分解酵素のうちアピラーゼ（ATP-ジホスファターゼ）は、ATPをADP（アデノシン-5'-二リン酸）と無機リン酸に、更に生じたADPをAMP（アデノシン-5'-一リン酸）と無機リン酸に加水分解する二段階の反応を触媒する酵素であるが、これ自体、血小板凝集抑制剤として使用されている（特表昭63-506842）。これは、アピラーゼが血小板凝集誘発剤、つまりトロンビン形成プロセスの開始剤として作用するADP（A. Gaarderand A. Hellem, *Nature*, 192, 531 (1961)）を加水分解するためである。更に、アピラーゼは上記の作用により、人工臓器、血液ポンプまたは人工血行回路などの材料として、あるいはこれらの器具のコーティング材料として使用される生体適合性の抗血栓材料の製造に不可欠である。

【0004】アピラーゼは、血小板凝集能検査においても欠かせない酵素であることも知られている。血小板凝集能検査は、先天性出血性疾患、特に先天性血小板機能異常症の診断に欠くことのできない検査であり、その多くは多血小板漿（血小板+血漿）を用いて実施されている。しかし、各種血小板機能異常を詳細に検討する場合、血小板を洗浄し血漿成分の影響を排除することが必要である。血小板の洗浄に用いられるTyrode液には、アピラーゼが添加されており（三上ら、*室蘭製鉄所病院医誌*, 28, 70 (1990)）、その有効性が示唆されている。

【0005】しかし、アピラーゼを初めとしたATP加水分解酵素は非常に不安定で、失活しやすいことが知られている。例えば、アピラーゼはガラスビーズとの接触で容易に失活する。このため、マレイン酸-エチレン共重合体やポリスチレンによるマトリックスや、高分子微粒子界面の脂質吸着層によりATP加水分解酵素を固定化させ、安定化を図る方法が示されている。しかし、これらの固定化方法では、固定化の際の失活や基質と酵素との結合頻度の大幅な低下が生じるため、有効な安定化方法とはいえない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】以上のような事実を鑑み、本発明は、アピラーゼを初めとするATP加水分解酵素を、種々の固定化方法を用いることなく、長期間に渡って高い活性を保持させ、しかも凍結や凍結乾燥後も高い活性を有することのできる安定化方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】即ち本発明は、ATP加水分解酵素をpH6.0～8.0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤を共存させることを特徴とするATP加水分解酵素の安定化方法に関する。

【0008】更に本発明は、ATP加水分解酵素をpH

6. 0～8. 0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤を共存させ、更にキレート剤を共存させることを特徴とする上記のATP加水分解酵素の安定化方法に関する。

【0009】更に本発明は、ATP加水分解酵素をpH 6. 0～8. 0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤を共存させ、更にタンパク質SH基保護剤を共存させることを特徴とする上記のATP加水分解酵素の安定化方法に関する。

【0010】更に本発明は、ATP加水分解酵素がアピラーゼである上記のATP加水分解酵素の安定化方法に関する。

【0011】更に本発明は、pH 6. 0～8. 0の緩衝液がグッドの緩衝液で総括される緩衝液のうちの1つである上記のATP加水分解酵素の安定化方法に関する。

【0012】更に本発明は、アルブミンがウシ血清アルブミンである上記のATP加水分解酵素の安定化方法に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明の安定化方法は、ATP加水分解酵素をpH 6. 0～8. 0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤、更にキレート剤やタンパク質SH基安定化剤を共存させる方法である。本発明に到達したのは、緩衝液の作用するpH領域、緩衝液の濃度、及び金属との結合係数等の性質を吟味し良好な緩衝液を選択したこと、ATP加水分解酵素の変性防止と活性部位の保護の作用をする添加剤を検討し、アルブミン、キレート剤、タンパク質SH基安定化剤が有効であることを見出したこと、及びATP加水分解酵素の活性を阻害しない防腐剤を見出したことによる。これにより、ATP加水分解酵素を、長期間に渡って高い活性を保持させ、しかも凍結や凍結乾燥後も高い活性を有することが可能となった。

【0014】本発明のATP加水分解酵素とは、ATPを加水分解しADPあるいはAMPと無機リン酸に加水分解する酵素のことであるが、ATPの分解産物であるADPをAMPと無機リン酸に加水分解する活性を有する酵素も含まれる。具体的には、アデノシントリホスファターゼ（酵素番号：EC 3. 6. 1. 3、 $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{無機リン酸}$ の反応を触媒する）、アピラーゼ（EC 3. 6. 1. 5、 $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{無機リン酸}$ 、 $\text{ADP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + \text{無機リン酸}$ の反応を触媒する）、ATPピロホスファターゼ（EC 3. 6. 1. 8、 $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + \text{ピロリン酸}$ の反応を触媒する）が示されるが、市販品として入手が容易なアピラーゼが頻繁に利用されている。

【0015】上記のATP加水分解酵素は、中性付近に活性の至適pHを有し、また中性付近のpHで安定である。従って、ATP加水分解酵素の安定化には、pH=6. 0～8. 0、好ましくはpH=6. 5～7. 8の緩衝液を用いることが必要である。このための緩衝液には、pHが中性領域を示す「蛋白質・酵素の基礎実験

法」（堀尾、山下編著：南江堂（1981））432～435頁記載の緩衝液を用いることができる。この中でも、1）水に溶けやすい、2）生体膜を通過しにくい、3）イオン強度が低い、4）種々の陽イオンと錯塩形成能が低い（形成してもその塩は水溶性である、などの特徴を有するグッドの緩衝液で総括される以下の緩衝液、すなわち、MES（2-モルホリノエタンスルホン酸）緩衝液、Tris（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）系緩衝液、BES（N, N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸）緩衝液、MOPS（3-モルホリノプロパンスルホン酸）緩衝液、HEPES（N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸）緩衝液、などを用いることが望ましい。緩衝液の濃度は、2～100mM、好ましくは10～50mMが望ましい。緩衝液濃度が2mM未満の場合、十分な緩衝能を得ることは難しく、一方、100mMを越える濃度の緩衝液を用いても、ATP加水分解酵素の安定性向上は期待できない。

【0016】pH 6. 0～8. 0の緩衝液中でATP加水分解酵素と共存するアルブミンは、ATP加水分解酵素と結合してATP加水分解酵素の構造を安定させ、変性を防止する作用を有する。パパイニン、トリプシン、キモトリプシン等のタンパク質に認められるタンパク質分解活性を示さない、可溶性のタンパク質であれば、上記の目的で用いることは可能であるが、アルブミンで総括される以下の可溶性タンパク質、即ち、オボアルブミン、ラクトアルブミン、血清アルブミン、ロイコシン、レグメリン、リシンから選ばれる一種以上以上のタンパク質を用いることが好ましく、特にウシ血清アルブミン（BSA）を用いることが望ましい。アルブミンの添加量は、ATP加水分解酵素を含む緩衝液1ml当たり0. 1～50mg、好ましくは0. 5～10mgが望ましい。

【0017】本発明のATP加水分解酵素の安定化方法に用いられる防腐剤は、混入する微生物の影響を最小限にするためのもので、ペニシリンG-Na塩、ペニシリンG-K塩、アンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリンなどの抗生物質、アジ化ナトリウムなどのアジ化物、クレゾールなどのフェノール化合物、乳酸、クエン酸、安息香酸、プロピオン酸、デヒドロ酢酸、オキシ安息香酸、ソルビン酸などの酸が挙げられる。この中で、特にアジ化ナトリウムを用いることが好ましい。防腐剤の添加量は、ATP加水分解酵素を含む緩衝液の0. 01～5. 0%、好ましくは0. 05～2. 0%が望ましい。

【0018】ATP加水分解酵素の安定化には、キレート剤が共存することも効果のある場合がある。キレート剤は、主に重金属の捕捉剤として作用するものであるが、エチレンジアミン四酢酸（EDTA、商品名Ver

sene)、ビスー(〇ーアミノフェノキシ)ーエタンーN, N, N', N'ー四酢酸(BAPTA)、エチレングリコールービスー(βーアミノエチルエーテル)N, N, N', N'ー四酢酸(EGTA)、ニトリロ三酢酸(トリグリシン、アンモニア三酢酸塩、トリロンA)、トランスー1, 2ージアミノシクロヘキサン四酢酸(CDTA)、ジエチレントリアミノペンタ酢酸(DTPA)、クエン酸塩、アルギニン、ハイボザンチン、4, 5ージヒドロキシベンゼンー1, 3ージスルホン酸、クラウンエーテルタイプ化合物およびこれら分子の全ての誘導体および前駆体などを使用することができる。

【0019】また、キレート剤と同様、タンパク質SH基保護剤が共存することもATP加水分解酵素の安定化に効果のある場合がある。タンパク質SH基保護剤は、ATP加水分解酵素の活性中心に存在するSH基を保護し安定して作用させるためのもので、グルタチオン、ジチオスレイトール(DTT)、メルカプトエタノール、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)などを使用することができるが、ジチオスレイトール(DTT)が特に好ましい。

【0020】ATP加水分解酵素はカルシウムイオンやマグネシウムイオンにより活性化することが認められており、ATP加水分解酵素を安定化させる目的で、これらのイオンが共存することが望ましい。その添加量は、カルシウムイオンは0. 1~50mM、好ましくは1~

20mMであり、マグネシウムイオンはカルシウムイオンの100分の1~10分の1である。

【0021】更に、ATP加水分解酵素を安定化させる目的で、グルコース、フルクトース、アラビノース、キシロース、サッカロース、トレハロース、ラクトース、マルトース、キシロビオースなどの糖類、マンニトール、キシリトール、ズルシトール、ソルビトール、リビトール、グルシトールなどの糖アルコール、PEG(ポリエチレングリコール) #400、PEG #600などの水溶性高分子、グリシン、セリン、プロリン、グルタミン酸、アラニンなどのアミノ酸、トリメチルアミンなどのアミン類、グリセロールなどの多価アルコールなどを添加することもできる。

【0022】本発明のATP加水分解酵素の安定化方法は、水溶液状態でのATP加水分解酵素の安定化を目的としたものであるが、水溶液を凍結あるいは凍結乾燥させた後、融解あるいは適当な溶液を添加して凍結乾燥品を溶解させた場合も、長期間に渡って高い活性が保持される。

【0023】

【実施例】以下、実施例によって本発明を説明するが、本発明の範囲がこれらの実施例にのみ限定されるものではない。

【0024】(実施例1) 25mMのHEPES-NaOH緩衝液(pH7. 0)を用いて、以下のような組成のATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

ATP加水分解酵素含有水溶液組成；

アピラーゼ(ジャガイモ由来、Sigma社製Grade )

BSA (INTERGEN社製) 1. 0mg/ml

NaN<sub>3</sub>

0

. 1%

EDTA

0. 1mM

DTT

1. 0mM

CaCl<sub>2</sub>

2. 0mM

MgCl<sub>2</sub>

0. 05mM

なお、上記ATP加水分解酵素含有水溶液中の酵素活性値を、ΔlogRLU/分=2. 0となるように調製した。

【0025】本発明では、ATP加水分解酵素の活性値を、ATP加水分解酵素によって基質であるATPが加水分解される速度をもって表す。従って、酵素活性の測定は被検液中のATP量の減少を経時的に測定することで実施され、被検液中のATP量は、ATPの鋭敏な定量法であるホタルルシフェラーゼを用いた生物発光反応から得られる相対発光量(RLU; 相対発光量, Relative LightUnit)を指標として測定される。本発明では、非連続的に被検液より一定量を採取してATP量を生物発光反応(ルシフェリン/ホタルルシフェラーゼを含有する発光試薬(東洋インキ製造(株)製 商品名: 菌士郎)を用いる)で測定し、得られた値から1分間当

たりの相対発光量の対数値の減少量(ΔlogRLU/分)を計算し、その値をもってATP加水分解酵素の活性値とした。

【0026】(実施例2) 実施例1の25mMのHEPES-NaOH緩衝液(pH7. 0)の代わりに25mMのMES緩衝液(pH6. 5)を用いて、その他は実施例1と全く同様の組成でATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0027】(実施例3) 実施例1の25mMのHEPES-NaOH緩衝液(pH7. 0)の代わりに10mMのHEPES緩衝液(pH7. 0)を用いて、その他は実施例1と全く同様の組成でATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0028】(実施例4) 実施例1のBSAの代わりにオボアルブミン(ニワトリ卵由来、Sigma社製Gr

a de )を用いて、その他は実施例1と全く同様の組成でATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0029】(実施例5) 実施例1のアピラーゼの代わりにアデノシントリホスファターゼ(カエル腎由来、Sigma社製)を用いて、その他は実施例1と全く同様の組成でATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0030】(比較例1) 実施例1の25mMのHEPES-NaOH緩衝液(pH7.0)の代わりに25mMのコハク酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)を用いて、その他は実施例1と全く同様の組成でATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0031】(比較例2) 実施例1の25mMのHEPES-NaOH緩衝液(pH7.0)の代わりに25mMのGTA緩衝液(pH9.0)('蛋白質・酵素の基礎実験'435頁記載)を用いて、その他は実施例1と全く同様の組成でATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0032】(比較例3) 実施例1に示されたATP加水分解酵素含有水溶液より、BSAを除いた組成のATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0033】(比較例4) 実施例1に示されたATP加水分解酵素含有水溶液より、 $\text{NaN}_3$ を除いた組成のATP加水分解酵素含有水溶液を調製した。

【0034】実施例1~5、及び比較例1~4に示されたATP加水分解酵素含有水溶液の調製直後のATP加水分解酵素活性値を、上記の方法で測定後、内面を撥水処理したガラス瓶に入れ、それぞれ4℃、25℃、35℃で48時間保ち、再度ATP加水分解酵素活性値を測定した。(48時間後のATP加水分解酵素活性値/調製直後のATP加水分解酵素活性値)×100の値を計算し、これをもって酵素活性の保持率(%)とした。表1に実施例1~5、及び比較例1~4の酵素活性の保持率を示した。本発明のATP加水分解酵素の安定化方法の条件を満足する実施例1~5では、48時間後も酵素活性は高く保持されることが認められたが、比較例1~4の条件では酵素活性の保持率が低く、ATP加水分解酵素の安定化方法としては不適切であった。

【0035】

【表1】

実施例及び比較例	活性保持率(%)		
	4℃	25℃	35℃
実施例1	98	95	85
実施例2	92	90	86
実施例3	95	89	78
実施例4	96	93	80
実施例5	96	94	92
比較例1	25	15	6
比較例2	30	19	5
比較例3	14	10	3
比較例4	40	20	3

【0036】実施例1、及び比較例1~4に示されたATP加水分解酵素含有水溶液の、調製直後のATP加水分解酵素活性値を上記の方法で測定後、内面を撥水処理したガラス瓶に入れ、-20℃で凍結させた。1日後にこれを25℃で融解させ、溶液を混和後ATP加水分解酵素活性値を測定した。再度これを-20℃で凍結させ、翌日融解後ATP加水分解酵素活性値を測定するという操作を更に二度繰り返した。それぞれのATP加水分解酵素活性値から、前述の計算方法と同様にして1日目、2日目、及び3日目の酵素活性の保持率(%)を計算した。表2に、実施例1、及び比較例1~4の酵素活性の保持率を示した。本発明のATP加水分解酵素の安

定化方法では、凍結-融解を繰り返しても酵素活性は高く保持されることが認められたが、比較例1~4の条件では、凍結-融解を一度行っただけで酵素活性が大きく低下し、ATP加水分解酵素の安定化方法としては不適切であった。ATP加水分解酵素を、ATPの測定や、生体適合性の抗血栓材料の製造、血小板の洗浄等に用いる場合、余ったATP加水分解酵素含有水溶液を凍結保存する方法が取られるが、本発明のATP加水分解酵素の安定化方法は、ATP加水分解酵素含有水溶液の凍結保存にも有効であることが認められた。

【0037】

【表2】

実施例及び比較例	活性保持率 (%)		
	1日目	2日目	3日目
実施例 1	96	96	92
比較例 1	62	35	16
比較例 2	53	28	18
比較例 3	8	2	0
比較例 4	55	48	35

【0038】実施例1、及び比較例1～4に示されたATP加水分解酵素含有水溶液の、調製直後のATP加水分解酵素活性値を上記の方法で測定後、内面を撥水处理したガラス瓶に入れ、LABCONCO凍結乾燥システムを用いて凍結乾燥させた。これを4℃で保存し、1カ月、3カ月、及び6カ月後に蒸留水を加えて溶解し、溶液のATP加水分解酵素活性値を測定した。それぞれのATP加水分解酵素活性値から、前述の計算方法と同様にして1カ月後、3カ月後、及び6カ月後の酵素活性の保持率(%)を計算した。表3に、実施例1、及び比較

例1～4の酵素活性の保持率を示した。本発明のATP加水分解酵素の安定化方法では、凍結乾燥後も酵素活性は高く保持されることが認められたが、比較例1～4の条件では、凍結乾燥により酵素活性が大きく低下し、ATP加水分解酵素の安定化方法としては不適切であった。本発明のATP加水分解酵素の安定化方法は、ATP加水分解酵素含有水溶液の凍結乾燥にも有効であることが認められた。

【0039】

【表3】

実施例及び比較例	活性保持率 (%)		
	1カ月後	2カ月後	3カ月後
実施例 1	87	85	80
比較例 1	40	28	20
比較例 2	36	30	26
比較例 3	10	5	2
比較例 4	58	42	25

【0040】

【発明の効果】本発明は、ATPの測定、血小板凝集抑制剤、生体適合性の抗血栓材料の製造、血小板の洗浄等に不可欠なATP加水分解酵素を安定化させる方法であり、ATP加水分解酵素をpH6.0～8.0の緩衝液中でアルブミン及び防腐剤、更にキレート剤やタンパク質SH基保護剤等を共存させることで、ATP加水分解

酵素を安定化させることができた。本発明により、ATP加水分解酵素を、種々の固定化方法を用いることなく、長期間に渡って高い活性を保持させることが可能であった。また、本発明のATP加水分解酵素の安定化方法は、ATP加水分解酵素含有水溶液の凍結、及び凍結乾燥後の活性保持にも有効であった。